

УДК 576.893.161.21:577:112.3

© 1990

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗАННЫХ АМИНОКИСЛОТ МЕСТНЫХ ШТАММОВ *TRICHOMONAS VAGINALIS*

А. Цветкова, Е. Осиковски, М. Василевска

Исследованы связанные аминокислоты водорастворимых и водонерастворимых белков *Tr. vaginalis*. В двух белковых гидролизатах выявлено по 17 аминокислот. При полном совпадении качественного состава в гидролизатах наблюдаются различия в содержании отдельных аминокислот. Полученные результаты подтверждают принадлежность исследованных штаммов *Tr. vaginalis* к разным серогруппам.

Изучение аминокислотного состава паразитических организмов представляется важным с разных точек зрения. Необходимы подобного рода данные при исследовании тонких механизмов взаимодействия между партнерами в системе паразит-хозяин. Они могут служить надежным маркером и при изучении проблем внутривидовой дифференциации паразитов. Весьма полезны сведения такого рода при разработке методов культивирования паразитических организмов *in vitro*.

В задачи настоящей работы входило сравнительное изучение аминокислотного состава водорастворимых и водонерастворимых белков восьми местных штаммов *Tr. vaginalis*. Это составная часть наших исследований по белковому и аминокислотному составу паразитических простейших рода *Trichomonas*, встречающихся у человека (Осиковски и др., 1983; Василевска, Цветкова, 1984; Цветкова, Василевска, 1985).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовано 8 штаммов *Tr. vaginalis* (№ 1—3, 16, 25, 46, 87, 148) из коллекции кафедры биологии и паразитологии ВМИ им. И. П. Павлова (г. Пловдив). Штаммы были выделены из содержимого влагалища женщин больных трихомонозным кольпитом на жидкой питательной среде Тримед (рН 6.2) (Jankov e. a., 1971). В течение 10 лет они поддерживались при температуре 37°. На каждые 4-е сутки они пересеивались на той же питательной среде. Штаммы принадлежат к трем различным серогруппам: I серогруппа — штаммы № 1, 3, 25; II серогруппа — № 16, 87, 148; III серогруппа — № 2, 46.

Биомассу из 48-часовой субкультуры каждого штамма, пятикратно промытую в физиологическом растворе для освобождения от сыворотки питательной среды, лизировали в трис-буфере (рН 8.3) в сухом льду при T — 78°. Разделение водорастворимых и водонерастворимых белков производили центрифугированием при 15 000 об./мин. Супернатант, содержащий водорастворимые белки и свободные аминокислоты, дополнительно обрабатывали 70-градусным этанолом. Для получения отдельных аминокислот гидролизаты, в которых содержание белка определялось колориметрически (Lowry e. a., 1951), подвергали

Т а б л и ц а 1
Аминокислотный состав водорастворимых белков (в М/%)

Аминокислоты, М/%	Номер штамма							
	1	3	25	16	148	87	2	46
	X+SD	X+SD	X+SD	X+SD	X+SD	X±SD	X+SD	X+SD
Основные								
Lys	13.67±0.34	12.84±0.41	13.44±0.28	9.19±0.08	9.32±0.11	9.11±0.18	8.27±0.14	8.55±0.17
His	3.83±0.05	3.70±0.11	3.77±0.08	2.68±0.01	2.65±0.10	2.66±0.05	2.14±0.03	2.20±0.10
Arg	6.96±0.30	6.21±0.45	6.36±0.18	4.64±0.12	4.92±0.18	4.71±0.13	4.00±0.17	3.65±0.30
Σ	24.46±0.70	22.75±0.55	23.84±0.60	16.51±0.18	16.89±0.23	16.48±0.18	14.41±0.24	14.40±0.30
Кислые								
Asp	9.52±0.31	10.23±0.48	9.63±0.28	10.33±0.44	9.92±0.45	9.25±0.51	11.10±0.38	10.34±0.35
Glu	9.74±0.22	9.88±0.26	9.35±0.40	9.78±0.78	11.13±0.30	11.58±0.41	12.42±0.45	11.52±0.45
Σ	19.26±0.48	20.11±0.59	18.98±0.41	20.11±0.61	21.05±0.45	20.83±0.40	23.52±0.83	21.86±0.78
Полярные								
Tre	5.18±0.09	5.10±0.10	5.17±0.01	5.92±0.23	5.25±0.38	5.67±0.24	5.78±0.28	5.22±0.28
Ser	5.00±0.03	4.94±0.14	5.03±0.10	5.63±0.20	6.13±0.35	5.85±0.23	5.59±0.08	5.75±0.14
Gly	7.03±0.55	6.24±0.48	5.68±0.83	7.20±0.99	8.64±0.70	9.63±0.80	8.10±0.70	9.50±0.63
Cys	1.92±0.10	1.99±0.14	1.81±0.20	2.06±0.15	1.98±0.14	1.84±0.17	2.29±0.20	2.12±0.28
Tyr	1.83±0.11	2.05±0.15	2.10±0.23	2.07±0.15	1.75±0.24	1.72±0.26	2.55±0.55	1.45±0.69
Σ	20.96±0.47	20.32±0.48	19.79±0.50	22.88±0.74	23.75±0.48	24.71±0.60	24.21±0.20	24.04±0.28
Неполярные								
Pro	6.21±0.25	6.18±0.08	6.31±0.10	5.20±0.44	6.21±0.41	5.35±0.45	4.93±0.58	6.09±0.60
Ala	6.44±0.07	6.57±0.10	6.61±0.13	7.74±0.35	7.37±0.48	8.23±0.51	7.72±0.11	7.50±0.18
Val	4.81±0.49	5.79±0.24	5.93±0.15	6.79±0.29	6.55±0.28	7.25±0.40	6.37±0.38	7.14±0.48
Met	следы	следы	следы	следы	следы	следы	следы	следы
Ile	5.75±0.28	5.39±0.43	6.08±0.20	6.85±0.27	5.48±0.45	3.90±1.20	6.43±0.59	5.24±0.49
Leu	8.01±0.22	8.54±0.35	8.15±0.24	9.56±0.38	8.67±0.31	8.83±0.41	8.81±0.15	8.82±0.07
Phe	4.09±0.23	4.37±0.19	4.37±0.24	4.95±0.38	4.01±0.43	4.41±0.17	4.45±0.05	4.34±0.17
Σ	35.31±0.40	36.84±0.59	37.45±0.38	41.11±1.41	38.29±0.48	37.97±0.61	38.71±0.38	39.13±0.24

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: X — средняя арифметическая по результатам 5 анализов, SD — среднее квадратичное отклонение.

Т а б л и ц а 2
Аминокислотный состав водонерастворимых белков (в М/%)

Амино- кислоты, М/%	Номер штамма							
	1	3	25	16	148	87	2	46
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Основные								
Lys	6.90±0.16	6.91±0.11	6.56±0.30	6.71±0.44	7.36±0.41	7.78±0.56	7.15±0.11	7.38±0.20
His	2.06±0.01	2.08±0.05	2.06±0.03	2.12±0.12	2.04±0.08	2.34±0.20	2.08±0.04	2.16±0.08
Arg	4.02±0.10	3.87±0.14	3.77±0.23	3.96±0.08	4.03±0.08	4.15±0.11	3.98±0.03	3.94±0.17
Σ	12.98±0.25	12.86±0.17	12.39±0.41	12.79±0.61	13.43±0.41	14.27±0.34	13.21±0.15	13.48±0.17
Кислые								
Asp	11.00±0.18	11.00±0.08	11.38±0.20	10.81±0.34	10.74±0.28	11.50±0.48	11.06±0.05	10.98±0.12
Glu	10.33±0.21	9.94±0.25	10.41±0.35	10.00±0.28	10.59±0.30	10.59±0.27	10.40±0.35	11.10±0.57
Σ	21.33±0.43	20.94±0.53	21.79±0.41	20.81±0.57	21.33±0.53	22.09±0.65	21.46±0.47	22.08±0.57
Полярные								
Tre	5.94±0.20	5.79±0.30	6.22±0.43	5.00±0.37	5.79±0.30	5.78±0.28	5.70±0.12	5.93±0.17
Ser	5.04±0.24	5.45±0.11	5.62±0.28	5.68±0.13	5.63±0.08	5.39±0.25	5.90±0.08	5.46±0.10
Gly	7.24±0.13	6.92±0.30	7.10±0.21	6.71±0.24	7.25±0.25	7.20±0.28	7.19±0.11	6.97±0.15
Cys	2.40±0.27	1.87±0.39	1.78±0.28	1.98±0.25	2.07±0.35	1.56±0.48	1.57±0.47	2.52±0.63
Tyr	2.54±0.45	3.61±0.58	2.80±0.43	2.93±0.31	2.44±0.53	3.27±0.48	3.18±0.42	2.35±0.54
Σ	23.16±0.34	23.58±0.18	23.52±0.22	22.30±0.39	23.18±0.41	23.10±0.48	22.94±0.14	23.23±0.20
Неполярные								
Pro	6.43±0.30	7.08±0.35	7.05±0.28	7.61±0.70	7.06±0.63	4.96±0.98	6.75±0.23	6.39±0.31
Ala	7.84±0.08	7.65±0.20	7.80±0.10	7.17±0.62	8.70±0.88	7.86±0.08	7.69±0.06	7.58±0.10
Val	6.51±0.15	6.21±0.23	6.55±0.17	6.53±0.06	6.44±0.08	6.38±0.10	6.57±0.01	6.58±0.05
Met	следы	следы	следы	следы	следы	следы	следы	следы
Ile	6.98±0.27	6.46±0.35	6.35±0.29	7.21±0.66	5.63±0.23	6.33±0.35	6.45±0.08	6.31±0.10
Leu	9.62±0.37	9.88±0.45	9.08±0.59	9.86±0.20	9.41±0.30	9.78±0.23	9.78±0.22	9.34±0.38
Phe	5.14±0.13	5.31±0.20	5.45±0.25	5.72±0.40	4.82±0.83	5.33±0.40	5.16±0.06	5.08±0.10
Σ	42.52±0.16	42.59±0.13	42.28±0.27	44.09±0.80	42.06±1.20	40.64±0.98	42.40±0.40	41.28±0.59

обычному кислотному гидролизу. 3—5 мг белка гидролизovali в 3 мл 6 Н НСl в запаянных ампулах при $T\ 110^{\circ}$ в течение 24 ч. После гидролиза хлороводород из проб удаляли путем многократного выпаривания.

Анализ аминокислот проводили по методу Мура и Штейна (Moore, Stein, 1963) на автоматическом аминокислотном анализаторе Beckman-Unichrom. При фракционировании кислых и нейтральных аминокислот использовали катионообменную смолу Векман типа M_{72} (высота столбика 56 см), а для основных — типа M_{81} (высота 6 см). Диаметр каждой колонны 0.9 см. Температурный режим работы обеих колонн 55° . Скорость элюирования 68 мл/час. Элюирование кислых аминокислот осуществляли 0.2 Н Na-цитратным буфером с рН 3.22, нейтральных с помощью того же буфера, но с рН 4.25. Буферные растворы меняли примерно через 100 мин; продолжительность всего анализа составила около 190 мин. Для фракционирования основных аминокислот использовали 0.35 Н Na-цитратный буфер (рН 5.28), продолжительность анализа — около 70 мин.

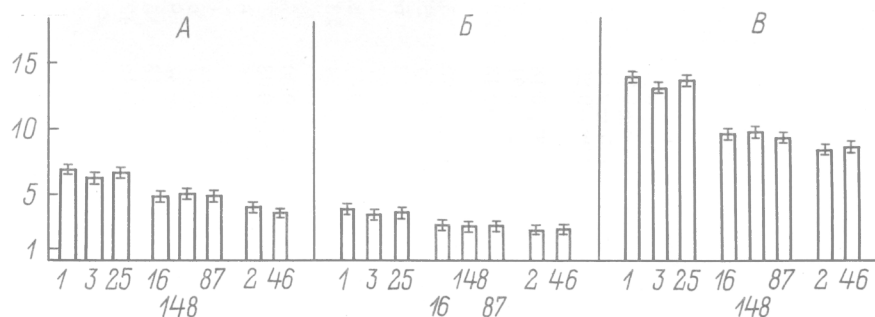
Для качественного и количественного определения содержащихся в отдельных гидролизатах аминокислот использовали стандартные калиброванные аминокислотные смеси фирмы Sigma.

Анализ каждой пробы повторяли 5 раз. Полученные результаты обрабатывали статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании белковых гидролизатов восьми штаммов *Tr. vaginalis* были выявлены 19 пиков, которые, как показало сравнение с результатами анализа стандартной смеси аминокислот, соответствуют порядку элюирования следующих соединений: лизина (Lys), гистидина (His), аммиака (Amn), аргинина (Arg), метионин-сульфоксида (Met-S-OH), аспаргиновой кислоты (Asp), треонина (Tre), серина (Ser), глутаминовой кислоты (Glu), пролина (Pro), глицина (Gly), аланина (Ala), цистина (Cys), валина (Val), метионина (Met), изолейцина (Ile), лейцина (Leu), тирозина (Tyr) и фенилаланина (Phe). Было определено количественное содержание всех идентифицированных аминокислот. Результаты исследования обоих белковых гидролизатов представлены в табл. 1 и 2. В них аминокислоты сгруппированы в зависимости от полярности их R-группы в основные, кислые, полярные и неполярные.

В табл. 1 представлен аминокислотный состав водорастворимых белков. Каждый из обследованных штаммов *Tr. vaginalis* содержит по 17 аминокислот, причем качественный состав последних одинаков. В наибольшем количестве



Количество основных аминокислот (в М/%) в водорастворимых белках штаммов, относящихся к разным серогруппам.

A — лизин; B — гистидин; B — аргинин; по оси абсцисс — номер штамма; по оси ординат — моль, %; I серогруппа — штаммы № 1, 3, 25; II серогруппа — штаммы № 16, 148, 87; III серогруппа — штаммы № 2, 46.

в водорастворимых белках представлены лизин, аспаргиновая и глутаминовая кислоты, лейцин, глицин и аланин, а в наименьшем — цистин, тирозин и гистидин. Метионин содержится в следовых количествах.

По количеству основных аминокислот (лизин, гистидин, аргинин) исследованные 8 штаммов можно разделить на три группы (см. рисунок). I группа включает штаммы № 1, 3, 25, содержащие наибольшее суммарное количество основных аминокислот со средним значением 23.68 М/%. II группа представлена штаммами № 16, 18, 148 — среднее значение суммарного содержания основных аминокислот 16.62 М/%. III группу составляют штаммы № 2 и 46, для которых характерно наименьшее суммарное содержание основных аминокислот (среднее значение 14.40 М/%). Выделение этих группировок полностью отражает принадлежность изученных штаммов к трем различным серогруппам, о чем говорилось выше.

По количеству полярных и неполярных аминокислот II и III серогруппы оказались сходными (достоверных различий между ними обнаружить не удалось). В штаммах I серогруппы эти аминокислоты имеются в достоверно меньших количествах ($p < 0.001$).

В водонерастворимых белках также выявлено 17 аминокислот (табл. 2). Наибольшее их количество приходится на аспаргиновую и глутаминовую кислоты, лейцин, аланин и глицин. Очень низким содержанием, так же как и в водорастворимых белках, характеризуются тирозин, цистин, гистидин и метионин. Сколько-нибудь четких различий между штаммами, относящимися к разным серогруппам, в этом случае выявить не удалось.

Водонерастворимые белки штаммов I серогруппы содержат в два раза меньше основных аминокислот, чем водорастворимые. В других серогруппах эти различия выражены значительно слабее.

Штаммы *Tr. vaginalis*, относящиеся к одной серогруппе, достоверно не отличаются друг от друга по содержанию отдельных аминокислот как в водорастворимых, так и в водонерастворимых белках.

Список литературы

- Василевска М., Цветкова А. Метод за екстрахиране и фракциониране на мембранно свързани протеини на шамове *Tr. vaginalis* // Годишна научна сесия на ВМИ «И. П. Павлов».
- Осиковски Е., Цветкова А., Василевска М. Изучаване аминокиселинния състав на *Tr. vaginalis* — шам 48 // Четвърта национална конференция по паразитологии. Варна, 1983. С. 219.
- Цветкова А., Василевска М. Проучване върху мембранно свързаните протеини на различни шамове *Tr. tenax* // Втори национален конгрес по медицинска биология и генетика с международно участие. София, 1985. С. 29.
- Jankov N., Cvetkova A., Andreeva N. About a new medium for culture of *Trichomonas vaginalis* // *Folia medica*. 1971. Vol. 13, N 2. P. 137—140.
- Lowry O. H., Rosenbrogh J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. P. 265—275.
- Moore S., Stein W. H. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment // *Methods in Enzymology*. N. Y.: Acad. Press, 1963. Vol. 6. P. 819—831.

ВМИ имени И. П. Павлова,
Пловдив

Поступила 17.03.1986
после доработки 1989

STUDY OF FIXED AMINO ACIDS OF LOCAL STRAINS OF TRICHOMONAS VAGINALIS

A. Tsvetkova, E. Ossikovsky, M. Vassilevska

S U M M A R Y

Amino acid composition of water-soluble and water-insoluble proteins of 8 strains of *Tr. vaginalis* is studied. 17 amino acids are found in both protein hydrolyzates. Despite the complete coincidence of their qualitative compositions there are reliable differences in the quantitative contents of some amino acids. Differences in the contents of main amino acids of water-soluble proteins of different strains reflect the belonging of the latter to different sero-groups. No reliable differences in the quantitative contents of amino acids of both water-soluble and water-insoluble proteins in strains belonging to one sero-group are recognised.
